In the name of Allah, the Most Gracious, the Most Merciful









Diagnostic des infections bactériennes

Cours de microbiologie

3ème Année Médecine

I- Définition :

Le Dc bactériologique regroupe l'ensemble des étapes de laboratoire qui apportent la preuve directe ou indirecte de l'infection bactérienne suspectée cliniquement.

On distingue :

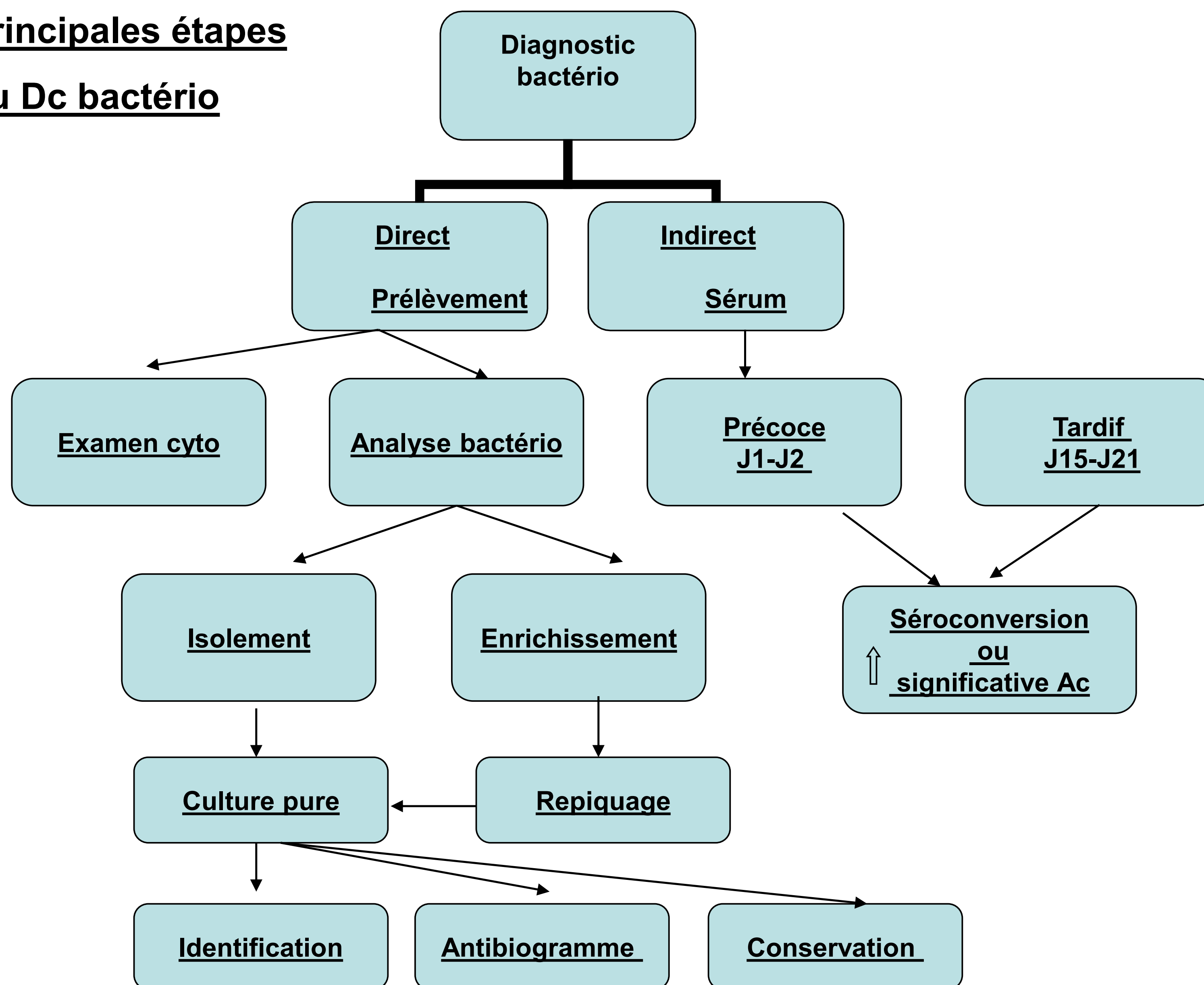
1. **Dc direct : qui permet d'isoler et d'identifier l'agent responsable, à partir d'un produit pathologique.**
2. **Dc indirect : qui permet de détecter les Ac anti-bactériens spécifiques, dans le sérum du malade.**

Intérêt

Le Dc bactériologique permet de:

1. Confirmer une infection suspectée cliniquement (ex. E.C.B. du LCR pour le Dc d'une méningite bactérienne)
2. Identifier l'agent incriminé dans l'infection (ex. identifier *Streptococcus pneumoniae* comme agent d'une méningite)
3. Rectifier ou de prescrire un trt ATB sur la base d'un antibiogramme
4. Dépister des infections cliniquement asymptomatiques (E.C.B. des urines chez la femme enceinte, sérologie syphilitique).

Principales étapes du Dc bactério



Dr AMMARI-Cours microbiologie-3ème année Médecine

II- Le Diagnostic Direct :

Il apporte la preuve **directe** de l'infection en révélant, dans le prélèvement :

- soit la bactérie par microscopie et /ou culture,
- soit des Ag bactériens
- soit de l'ADN bactérien

Principes généraux des prélèvements bactériologiques :

En biologie, le prélèvement doit répondre à des critères de qualité car, de la qualité du prélèvement dépend la valeur et la fiabilité du résultat de l'analyse.

Ces critères de qualité sont :

- **Concernant le prélèvement proprement dit :**

1. **Prélever avant toute antibiothérapie sinon sous fenêtre thérapeutique de 4 jours**
2. **Effectuer une désinfection correcte du site de prélèvement ainsi que des mains du personnel chargé du prélèvement**
3. **Utiliser du matériel stérile pour réaliser et collecter le prélèvement ;**
4. **Respecter un volume suffisant du prélèvement destiné à l'analyse.**

Transport et conservation :

- Le prélèvement doit être transporté rapidement au laboratoire d'analyse.
- Le délai de transport ne doit pas dépasser une heure en moyenne.

Température et atmosphère de conservation du prélèvement en attendant l'analyse, on distingue :

T° Consevation	**37°C (étuve)**	**+4°C (réfrigérateur)**	**Mise en culture immédiate Pas de conservation**
Prélèvements	**Hémocultures, LCR Liquides de ponction, Pus d'abcès non fistulisés Prothèses Pièces opératoires**	**Urines post-mictionnelles Selles Expectorations Moins 2 heures.**	**Prélèvement de gorge, Pus d'oreille, Abcès fistulisés, Pvts gynécologiques Pvts génitaux masculins.**
Remarques	**ils ne comportent aucune flore microbienne associée.**	**une flore microbienne qui risque d'interférer avec l'agent causal. La multiplication de cette flore est ralentie à +4°C.**	**ils ne tolèrent pas de conservation Ces prélèvements seront si possible effectués au laboratoire et mis en culture immédiatement.**

Précautions supplémentaires (préserver la viabilité des germes délicats):

• LCR : les agents de méningite purulente (*S. pneumoniae* , *N. meningitidis* et *H.influenzae* sont fragiles et ne supportent pas les variations de température . Il faut envelopper les tubes dans du coton pendant le transport.

• Hémoculture : les flacons d'hémoculture transportés dans du coton afin de les conserver à une T° voisine de 37°C.

• Prélèvements génitaux : certains germes nécessitent un milieu de transport :
Ex : Milieu de STUART pour *N.gonorrhoeae.*

• Pus d'abcès non fistulisés : Après ponction de l'abcès à la seringue, le pus est aspiré puis l'air est totalement éliminé du piston .On adresse ensuite la seringue au laboratoire d'analyse.

• Pus d'abcès fistulisés : le pus est prélevé à l'aide d'un écouvillon stérile .Pour préserver la viabilité des bactéries anaérobies strictes, on utilise une Culturette-anaérobie.

2- Exemples de prélèvements

a- Urines :

1. **Prélever les urines avant toute antibiothérapie**
2. **Prélever les urines ayant séjourné au moins 4 h dans la vessie**
3. **Le prélèvement est précédé d'un lavage soigneux des organes génitaux externes, d'avant en arrière, à l'eau et au savon ou au dakin, suivi d'un rinçage à l'eau.**
4. **Le malade élimine le 1er jet d'urine, puis prélève 20 ml du milieu du jet, directement dans un flacon stérile fourni par le laboratoire ;**
5. **Les urines doivent être transportées au laboratoire d'analyse en moins d'1 h.**
6. **Les urines peuvent être conservées à +4°C pendant une durée ne dépassant pas 2h.**

b- Selles :

1. **Prélever les selles avant antibiothérapie**
2. **Prélever les selles fraîches du matin, la quantité de selles doit être suffisante pour l'analyse.**
3. **Le récipient utilisé est un flacon stérile ou, à défaut très propre.**
4. **Conservation < 2h à +4°C en attendant l'analyse.**

c- Prélèvement pour hémoculture **(se désinfecter les mains à la bétadine et porter des gants stériles):**

1. **Prélever le sang avant toute antibiothérapie**
2. **Prélever au moment des pics fébriles ou des frissons**
3. **Désinfecter la veine du centre vers la périphérie (alcool iodé Bétadine ou alcool à 70°, 2fois)**
4. **Désinfecter (à la Bétadine) le bouchon du flacon d'hémoculture**
5. **Utiliser du matériel de prélèvement stérile**
6. **Prélever 3 à 4 hémocultures espacées d'au moins 30 mn**
7. **Prélever 10 ml de sang/flacon chez l'adulte , 5 ml/flacon chez l'enfant , 1 ml/flacon chez le NRS**
8. **Homogénéiser les flacons et les incuber à 37°C –**

Ne jamais mettre au réfrigérateur !



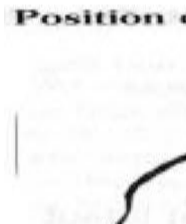
d- Suppurations :

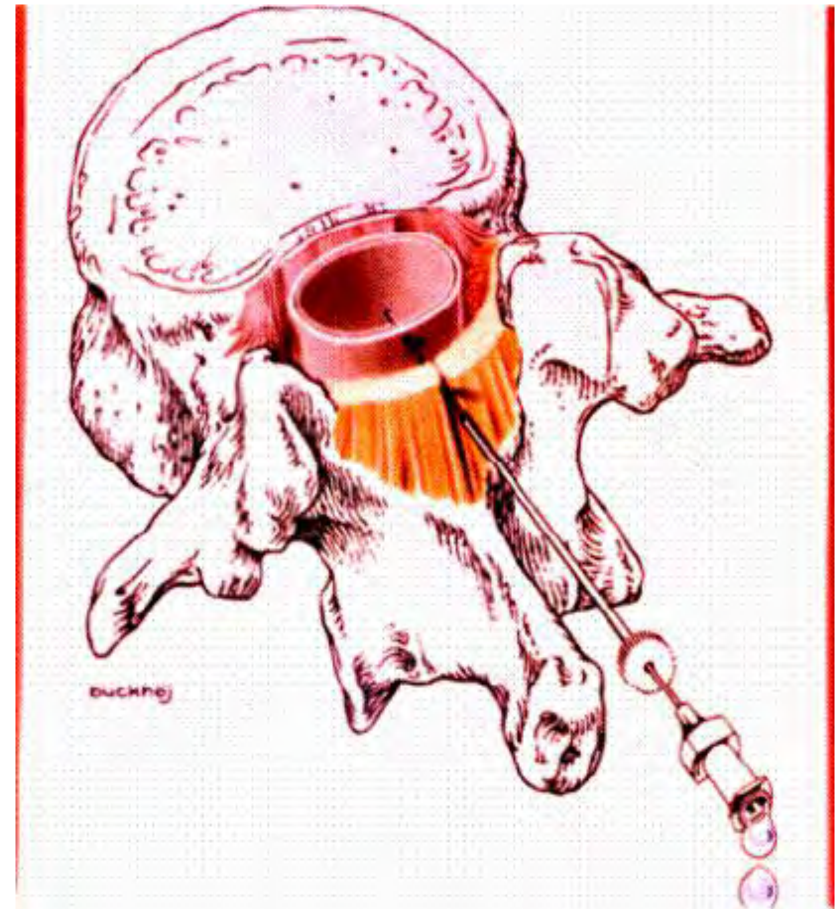
1. **Prélever avant toute antibiothérapie**
2. **Désinfecter la peau du centre vers la périphérie**
3. **Ponctionner l’abcès à l’aiguille montée sur une seringue stérile**
4. **Aspirer le pus**
5. **Une fois l’aiguille retirée , chasser l’air de la seringue**
6. **Adresser la seringue au laboratoire d’analyse**



e- LCR : (porter des gants stériles)

1. Désinfecter l'espace inter-vertébral L4-L5 ou L5-S1 du centre vers la périphérie à la bétadine
2. Ponctionner avec une aiguille avec mandrin stérile
3. Laisser s'écouler 2 à 5 ml de LCR dans un tube stérile
4. Envelopper le tube dans du coton et le transporter rapidement au laboratoire d'analyse. **Ne jamais mettre au réfrigérateur !**





3- Fiche de renseignements cliniques :

- Elle est primordiale

- Elle accompagne obligatoirement tout prélèvement destiné à une analyse microbiologique

- Elle doit comprendre :

- **Nom , prénom , âge**
- **Si le malade est hospitalisé , le nom du service**
- **Date de prélèvement**
- **Nature du prélèvement**
- **Dc clinique ou à défaut : un résumé clinique**
- **Trt ATB en cours ou datant de moins de 7 jours**

Traitement des prélèvements au laboratoire

- Chaque prélèvement reçu doit être accompagné d'une fiche de renseignements correctement remplie
- Les prélèvements sont enregistrés dans un registre de laboratoire
- Un numéro d'ordre interne au laboratoire leur est attribué (numéro inscrit sur la FR et sur le prélèvement)

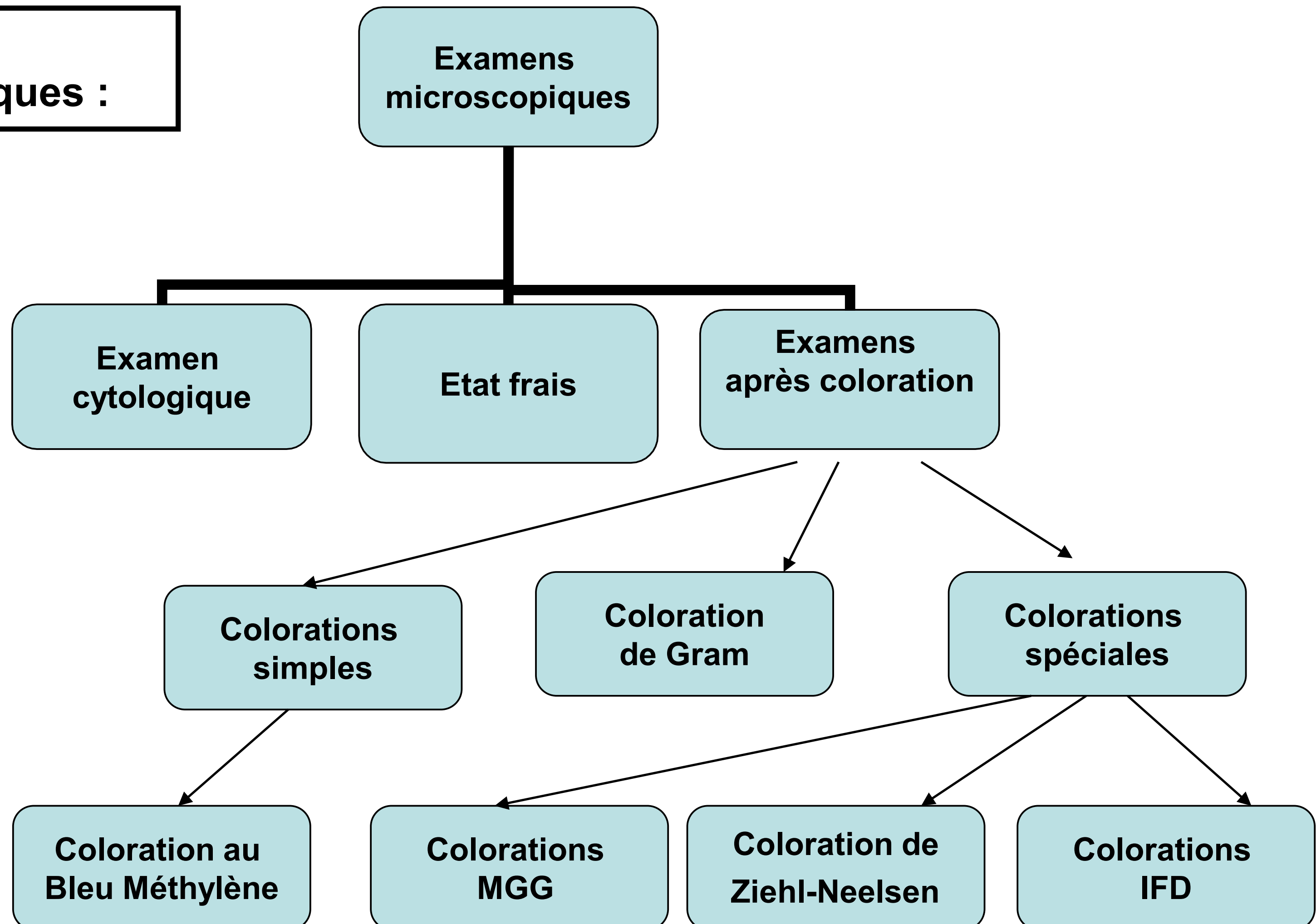
Examen macroscopique

Il fournit des informations importantes et a une valeur d'orientation:

Exemples:

- **Urine: claire, trouble, hématique…**
- **LCR: clair, purulent, eau de riz…**
- **Selle: normale, moulée, diarrhéique, glaireuse…**
- **Pus: couleur, odeur…**

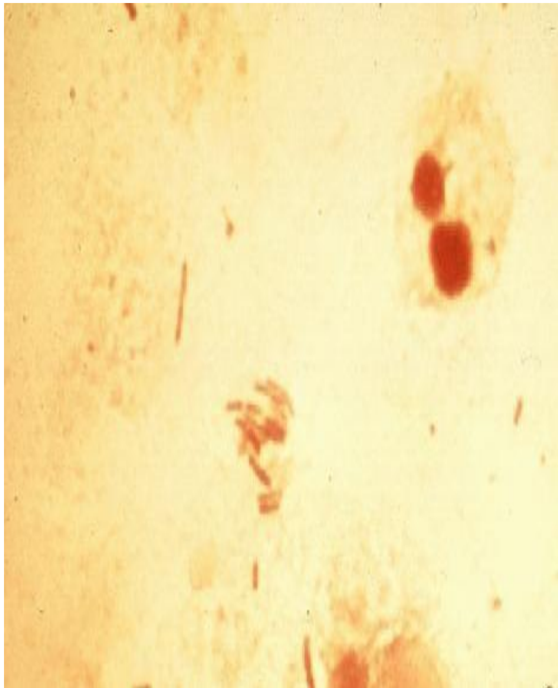
4- Examens microscopiques :

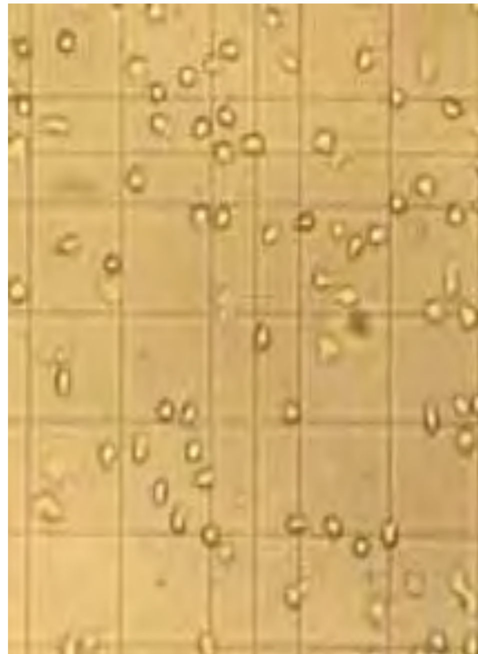


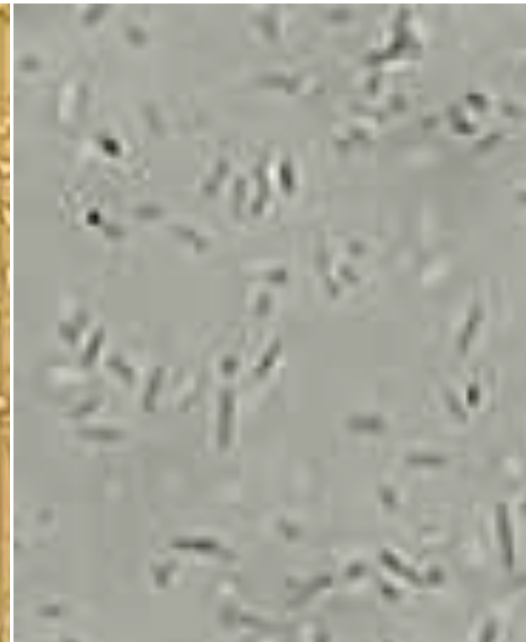
Examen cytologique :

- **Apprécie la réaction inflammatoire et la chiffrer par mm3 (ex. examen d'un LCR : 500 leucocytes / mm3).**
- **Précise le caractère des cellules inflammatoires (PN altérés ou non,lympho).**

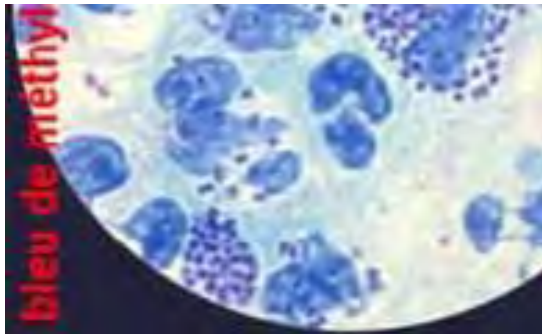
Etat frais : Examen d'une goutte de prélèvement entre lame et lamelle ; détecte les bactéries à l'état vivant, leur morphologie et mobilité.







- **Les examens après coloration :**





Colorations simples :
ex. coloration au bleu de méthylène

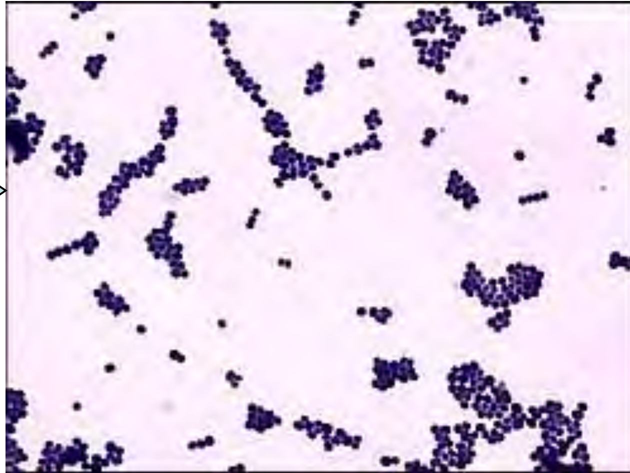
Coloration de Gram (4 temps) :
- **Violet de gentiane : 1 mn**
- **Lugol : 1mn**
- **Alcool : 1 mn**
- **Fuchsine :30 sec**

Dr AMMARI-Cours de microbiologie-
3ème année Médecine

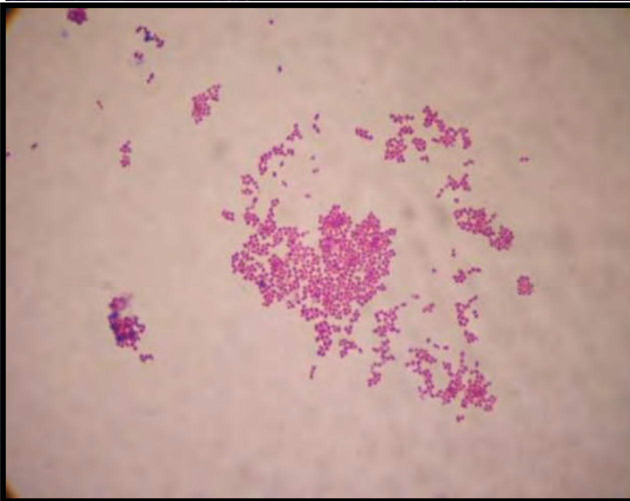
Coloration de Gram

BGP

CGP









CGN

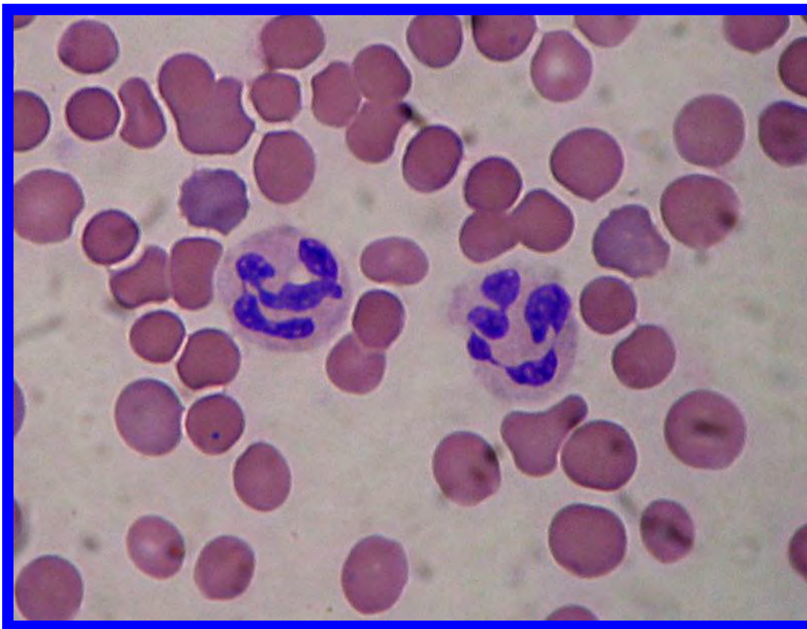
BGN

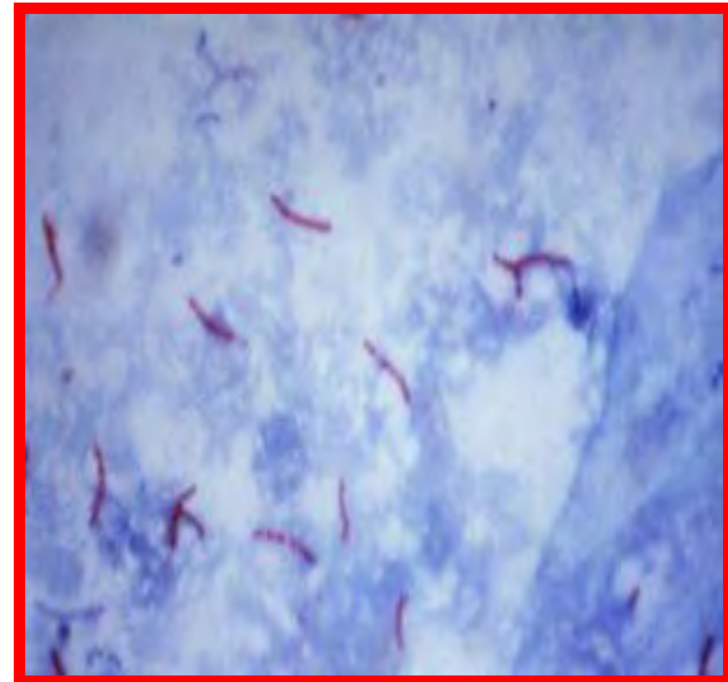
Dr AMMARI-Cours de microbiologie-
3ème année Médecine

Colorations spéciales

- **Coloration au MGG (May – Grünwald-Giemsa):apprécie la richesse et la morphologie des cellules d'un prélèvement**

- **Coloration de Ziehl-Neelsen : recherche des bacilles acido-alcoo-résistants (ex. le BK)**



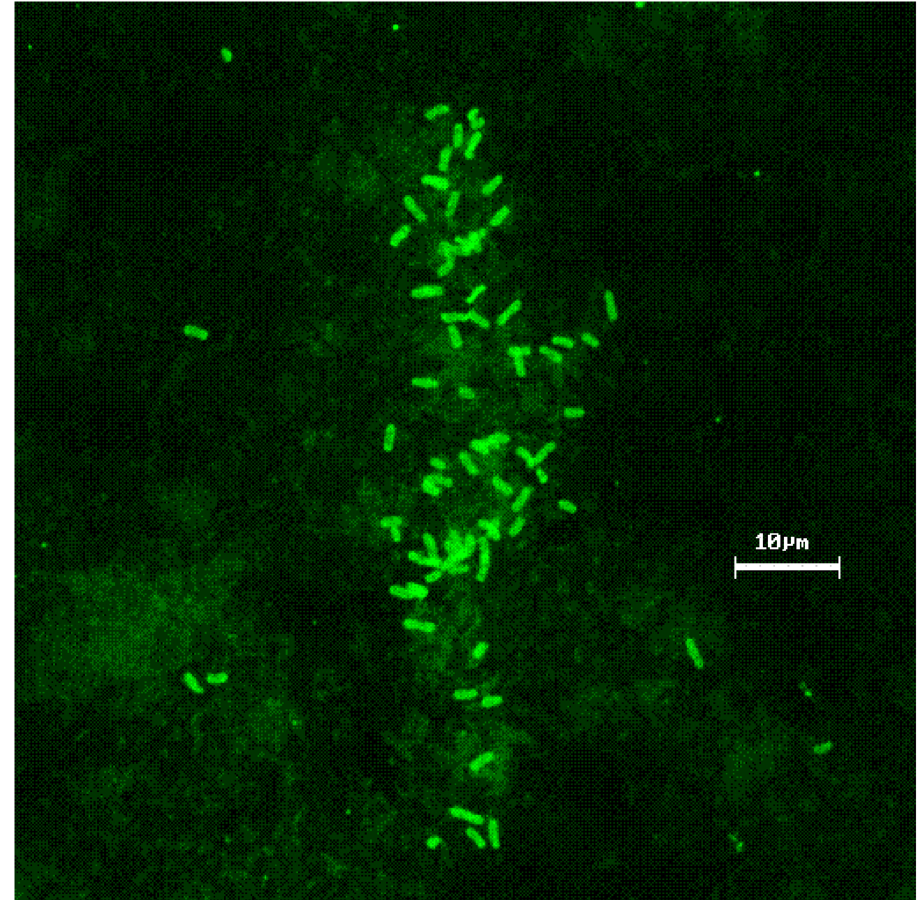


Dr AMMARI-Cours de microbiologie-
3ème année Médecine

-Immuno-Fluorescence Directe (IFD):

- Utilisée pour révéler la présence de certaines bactéries de culture difficile, directement à partir du prélèvement , en mettant en évidence les Ag bactériens grâce à un Ac monoclonal marqué à la fluoresceine.

- ex: *Chlamydia , Legionella , Mycoplasma*



IFD

5- Cultures :



a- Milieux d'isolement : ce sont des milieux de culture utilisés pour isoler le ou les agents infectieux à partir du prélèvement.
Le choix de ces milieux est guidé par la nature du prélèvement et les germes recherchés.
Ils peuvent être des:

- **Milieux ordinaires :ex. la gélose nutritive**
- **Milieux enrichis par du sang, du sérum ou autre (ex. gélose au sang cuit)**
- **Milieux sélectifs d'isolement (ex. milieu de Chapman)**
- **Milieux sélectifs d'enrichissement (ex. Eau peptonée alcaline)**

Après ensemencement , ces milieux sont incubés à 37°C .
Le délai d'incubation dépend de la nature des germes recherchés.
ex :

- ***N.gonorrhoeae*** **: 48 h**
- **Enterobactéries , *Staphylococcus* : 24h**

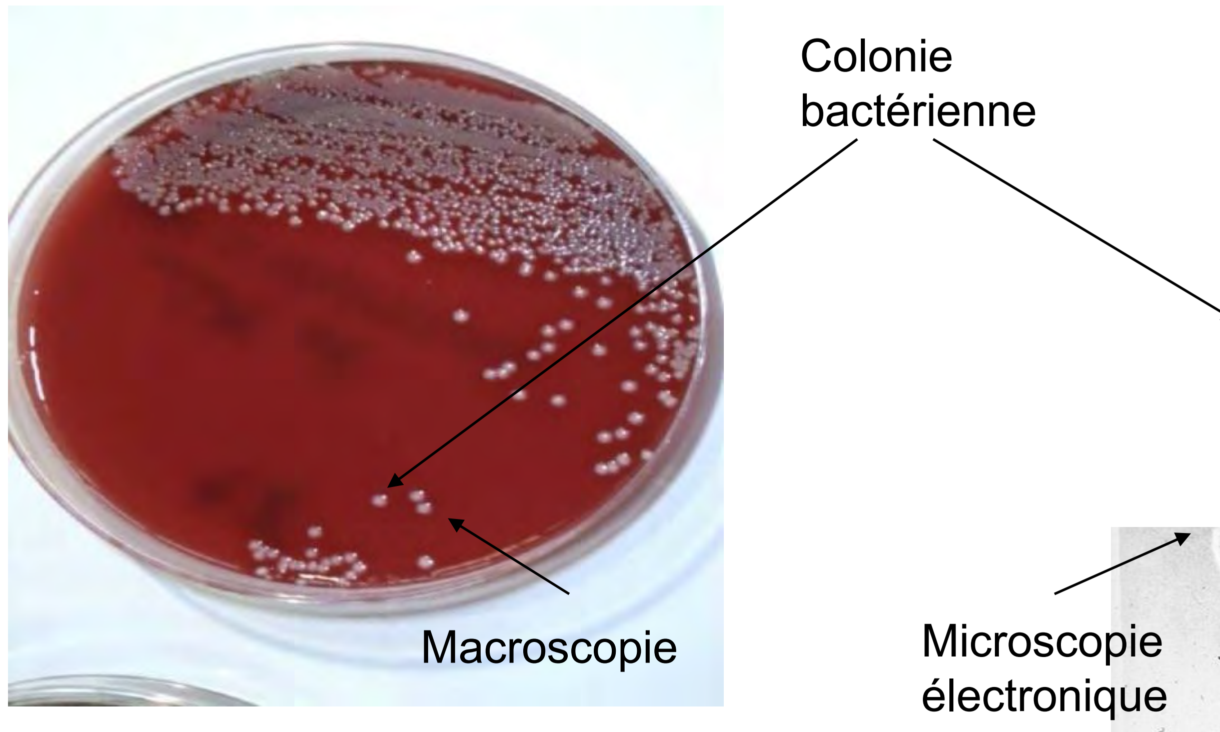
L'atmosphère d'incubation dépend des germes recherchés :
Ex:

- ***N.meningitidis , S.pneumoniae , N.gonorrhoeae*** **: incuber sous CO_2**
- **Anaérobies stricts : incuber en anaérobiose.**



Milieux d'identification :

Après incubation, on examine les milieux de culture : les colonies bactériennes sont reconnues par leurs caractères culturaux (aspect, pigmentation, odeur).



Dr AMMARI-Cours de microbiologie-
3ème année Médecine

- **Tests biochimiques permettent de déterminer la famille, le genre et l'espèce de la bactérie étudiée.**
- **Des milieux d'identification biochimique sont utilisés pour déterminer le type respiratoire ou fermentaire, les caractères métaboliques ….**
- **L'identification peut prendre 24h à plusieurs jours.**

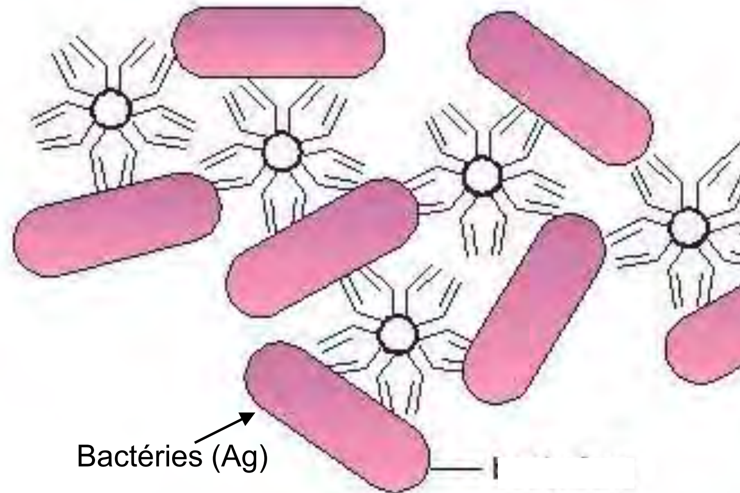


Galerie biochimique d'identification

A partir des colonies bactériennes, on peut également effectuer l'identification antigénique par agglutination à l'aide de sérums spécifiques préparés chez l'animal

Ex: sérotypie des Salmonelles et de *P.aeruginosa*

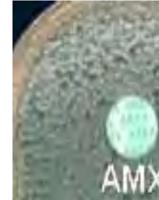
Particules de latex sensibilisées par des Ac connus





Dr AMMARI-Cours de microbiologie-
3ème année Médecine

6- L'antibiogramme :



Il consiste à mettre en contact le germe avec des disques de papier buvard imprégnés d'un ATB donné

Pour cela , on étale une suspension microbienne du germe étudié , sur la surface d'un milieu Mueller-Hinton et on place les disques d'ATB sur la gélose.

Après 24 h d'incubation à 37°C, des zones d'inhibition apparaissent autour de chaque disque .

Le diamètre de chaque zone est comparé à un diamètre critique , ce qui permet de classer la bactérie dans la catégorie R , I ou S.

Exemple de Dc bactério :

L'ECBU

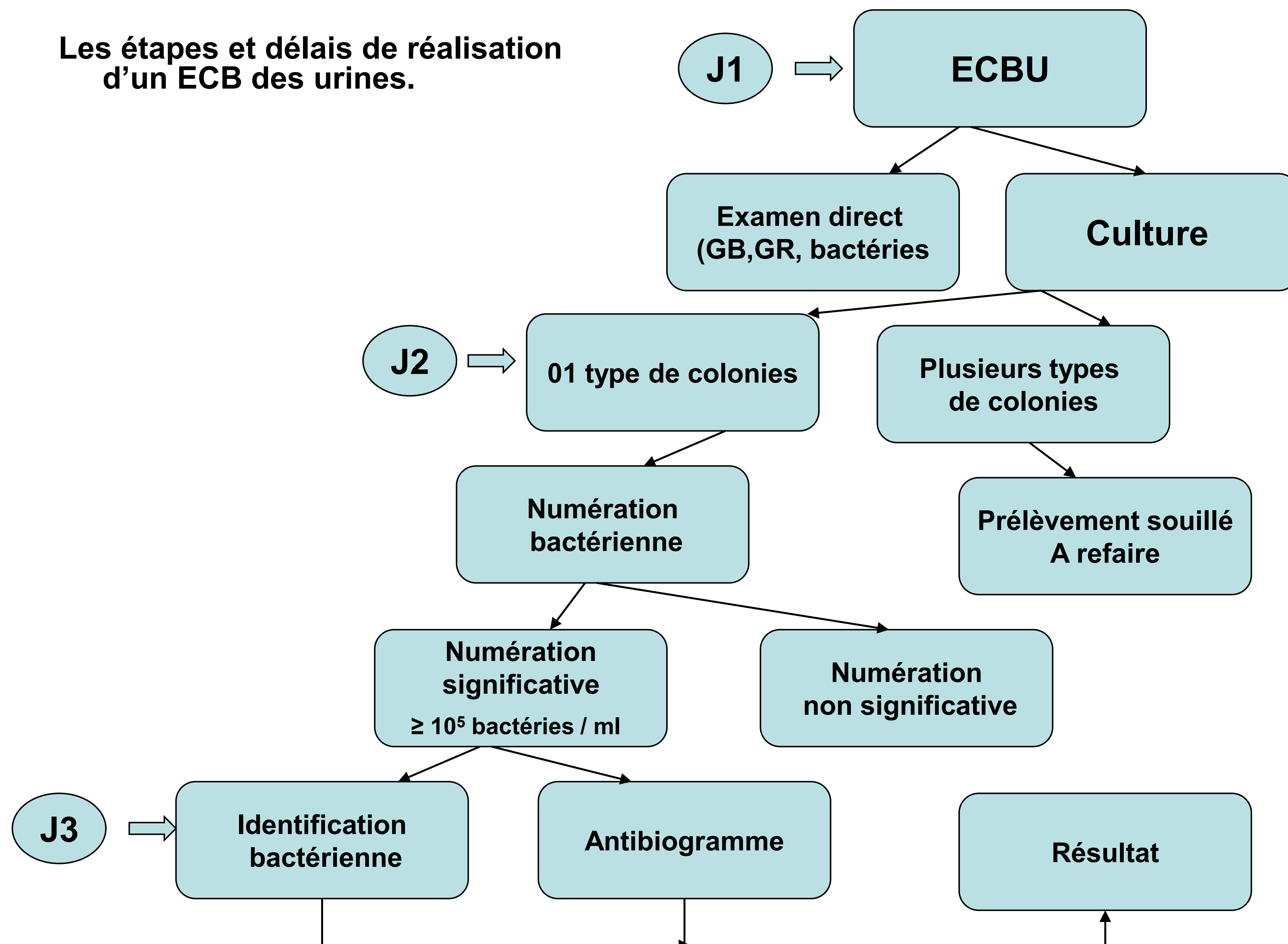
Dc:
Numération des germes urinaires ou bactériurie

-Infection urinaire si la bactériurie ≥ 10^5 bactéries / ml d'urine (bactériurie significative) avec ou sans leucocyturie.

Dans ce cas:
-Identification de la bactérie responsable
- Antibiogramme.



Les étapes et délais de réalisation d'un ECB des urines.



Dr AMMARI-Cours de microbiologie-
3ème année Médecine

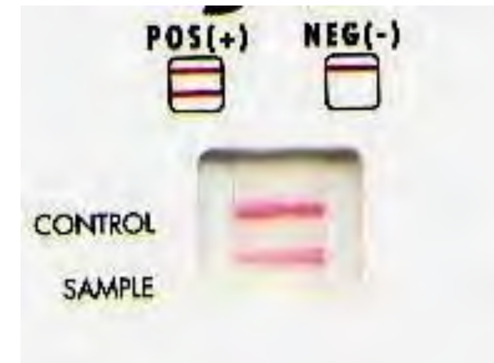
8- Autres diagnostics directs :

a- Recherche des Ag solubles bactériens : appliquée dans le Dc des infections méningées et respiratoires.

On peut utiliser :

- **agglutination de Latex sensibilisé aux Ac anti-microbiens spécifiques :** (*N.meningitidis , de S.pneumoniae , d'H.influenzae, L.monocytogenes* , dans un prélèvement de LCR).
- **la CIE :** (*N.meningitidis ,S.pneumoniae , d'H.influenzae ,Listeria monocytogenes* , dans LCR (ou de liquide pleural). C'est une technique de migration électrophorétique sur gel.
- **Immunochromatographique sur membrane**: *Legionella pneumophila* et *S.pneumoniae* dans les urines du patient

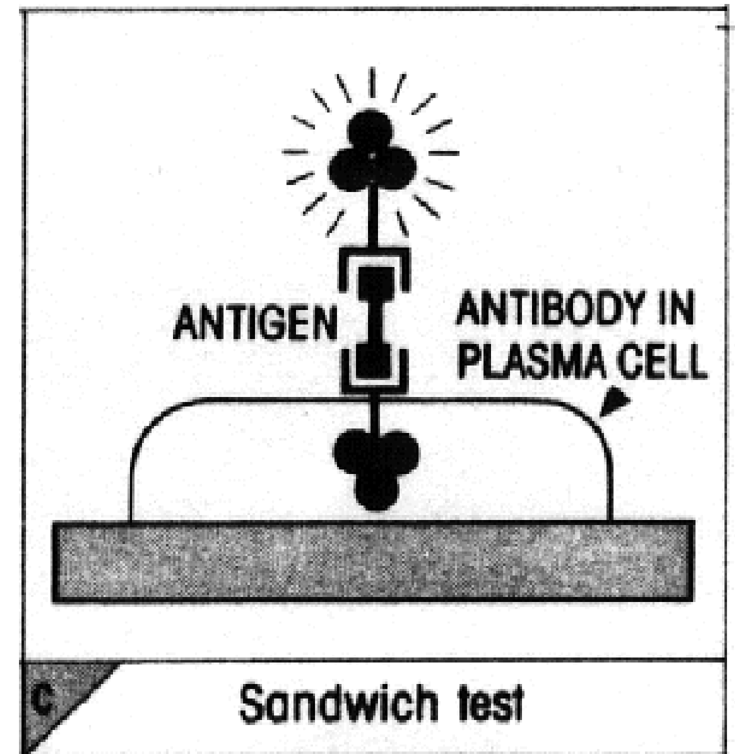




Dr AMMARI-Cours de microbiologie-
3ème année Médecine

b- Recherche des Ag bactériens par : Technique ELISA-SANDWICH :

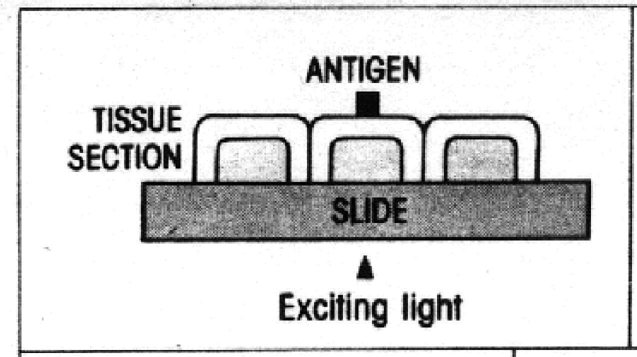
- Les puits d'une microplaque sont sensibilisés avec un Ac spécifique de la bactérie recherchée .
- Un échantillon de prélèvement est ajouté dans les puits .
- Le complexe Ag-Ac formé est révélé par addition d'un Ac monoclonal marqué à une enzyme , puis du substrat spécifique à l'enzyme .
- La DO ou densité optique , mesurée au niveau des puits, permet d'incriminer la bactérie correspondante.

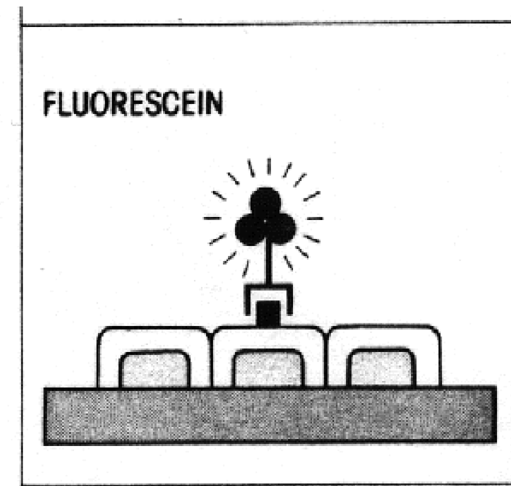


Applications : recherche de *Chlamydia trachomatis* , *Chlamydia pneumoniae* , *Legionella pneumophila* , *Mycoplasma*…

Techniques d'Immunofluorescence Directe et techniques Radio-Immunologiques :

• L'Ac spécifique de la bactérie recherchée, est fixé sur un support ;
• On met en contact cet Ac avec le prélèvement du patient .
• Si ce prélèvement renferme les microorganismes recherchés, il y a réaction Ag-Ac .
• On révèle cette réaction en ajoutant un Ac monoclonal marqué soit par la fluorescéine (IFD), soit par un isotope radioactif (technique radio-immunologique).





NB: Actuellement, on emploie dans le Dc biologique, les techniques d'IF ou les techniques immuno-enzymatiques (moins nocives que les techniques radio-immunologiques) .

III- Diagnostic Indirect ou Sérologique :

1- Définition et intérêts :

Le Dc indirect: la mise en évidence chez le patient, d'Ac spécifiques développés suite à une infection bactérienne.

Deux (02) prélèvements de sérum:

-1er : au début de la maladie

- 2ème :2 à 3 semaines.

- sur tube sans anticoagulant (tube sec).

Les sérums peuvent être conservés à – 20°C.

On détecte une augmentation significative du titre des Ac entre le sérum précoce (J1-J2) et le sérum tardif (J15-J21).



Intérêts du diagnostic sérologique:

Intérêt diagnostique : si la bactérie incriminée est difficilement cultivable ou s'il s'agit d'une infection décapitée par un traitement.

Suivi thérapeutique : l'évolution de la cinétique des Ac spécifiques est utile dans le suivi de plusieurs infections (Syphilis , Brucellose).

Appréciation de l'efficacité d'une vaccination :
ex: Diphtérie, Tétanos

Réalisation d'enquêtes épidémiologiques : évaluer le statut immunitaire d'une population (séroprévalence).

2- Les techniques sérologiques :

Les techniques sérologiques sont nombreuses et variées .Elles diffèrent par :

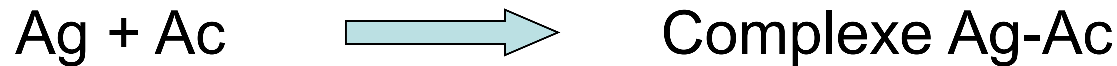
- La méthode opératoire

- La sensibilité : elle est évaluée par le seuil de sensibilité ou seuil de lecture, qui est la valeur au dessous de laquelle le test est considéré comme négatif. Cette valeur est généralement égale à 2 ou 2,5 fois la moyenne des valeurs retrouvées pour des sérums négatifs (sujets sains).

- La spécificité :Elle est étudiée en comparant des sérums connus , positifs ou négatifs.

- La reproductibilité : elle est évaluée en étudiant plusieurs fois par une technique donnée, un même sérum positif de titre connu.

Les techniques sérologiques utilisent le principe de la réaction immunologique antigène-anticorps :



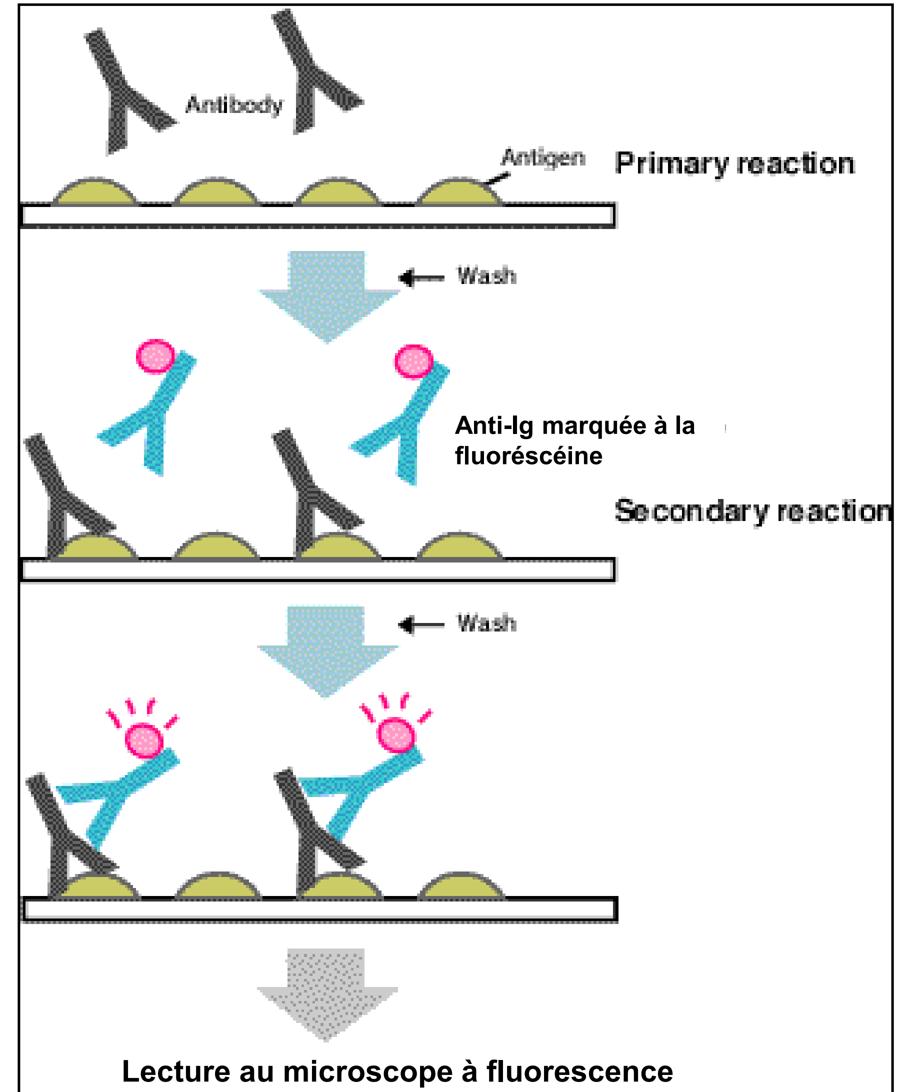
La présence d'Ac sériques spécifiques est révélée par contact entre le sérum du malade et un Ag bactérien connu.

Les principales méthodes utilisées sont :

- Immunofluorescence
- Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)
- Agglutination passive

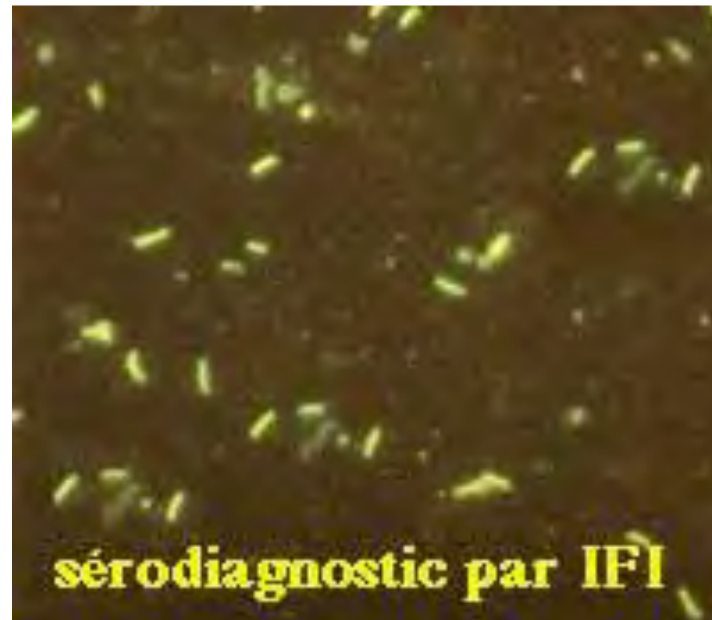
Immunofluorescence Indirecte :

- Le sérum du malade est déposé sur une lame portant l'Ag connu fixé .
- Incubation
- on dépose sur chaque spot une goutte d'anti-Ig (anti IgG ou anti IgM ou anti-IgA) marquée par un Fluorochrome
- Incubation puis lavages
- Lecture au Microscope à Fluorescence détectant une fluorescence caractéristique permet de doser l'Ac sérique spécifique.



Applications:

Infections à bactéries à multiplication intra-cellulaire ou à croissance complexe (*Chlamydia* , *Mycoplasma* , *Legionella* , *Brucella* …)

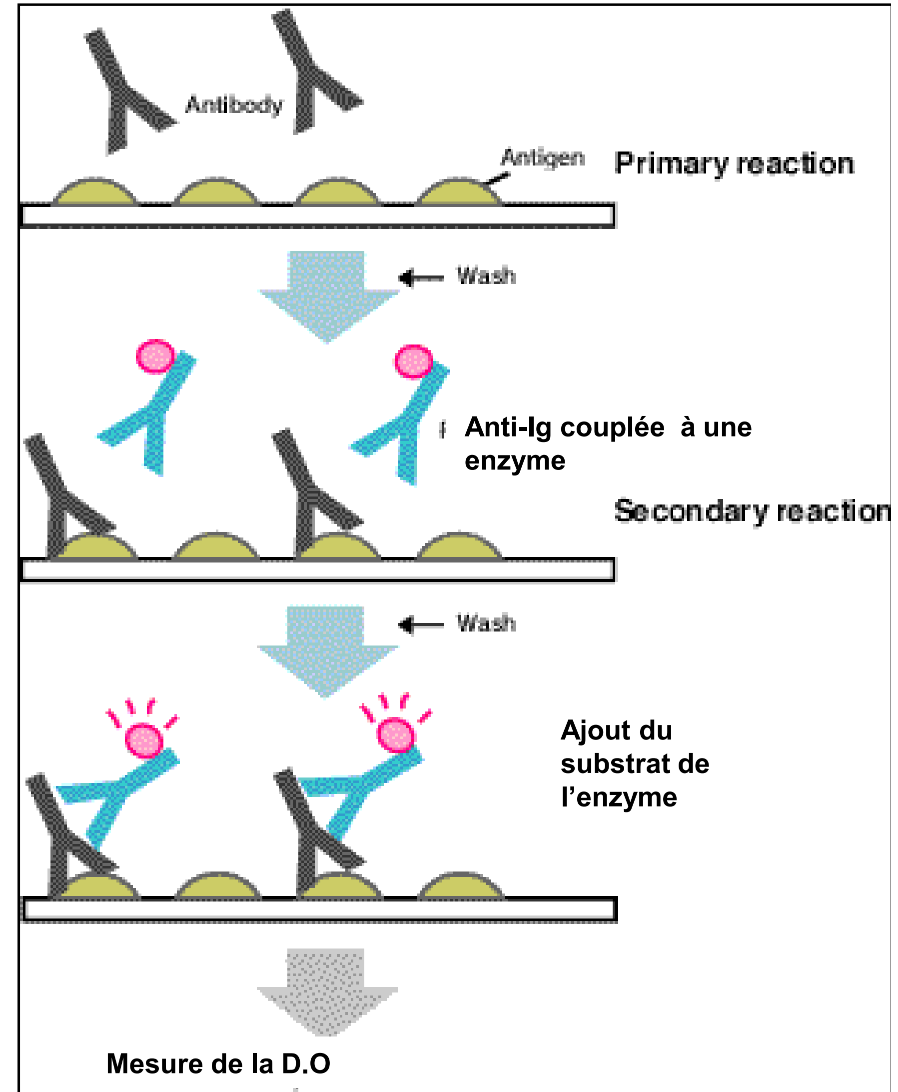


Dr AMMARI-Cours de microbiologie-
3ème année Médecine

- Les techniques Immuno-enzymatiques (ELISA) :

- Ag bactérien fixé au fond des puits d'une microplaque .
- On dépose chaque dilution du sérum de malade dans un puits.
- Après incubation et lavages , on dépose dans chaque puits une anti-Ig (Anti-IgG , ou anti-IgM) couplée à une Enzyme .
- Après une 2ème période d'incubation et des lavages , on rajoute un substrat dans chaque puits.
- Si présence d'Ac sériques spécifiques , l'enzyme agit sur le substrat qui est hydrolysé et change de couleur (Densité optique) .

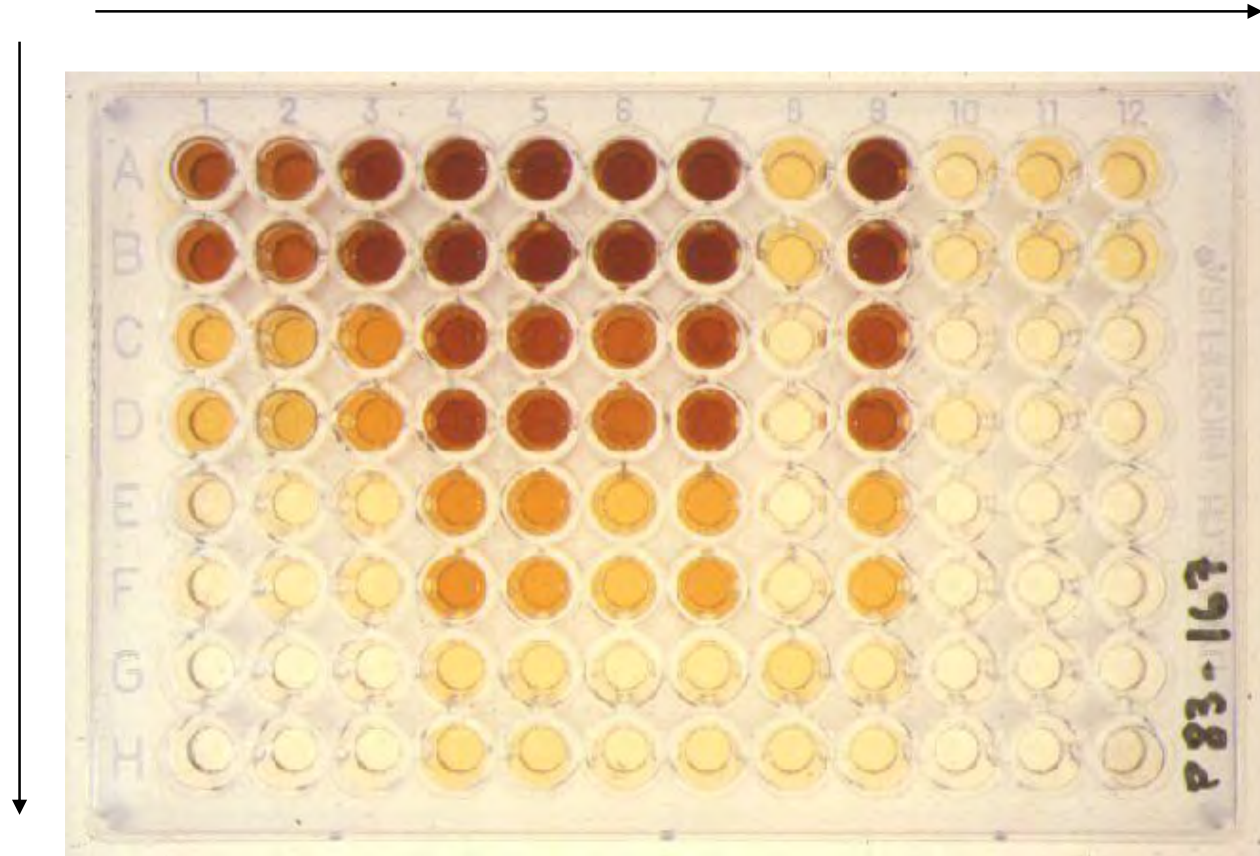
Ces techniques très sensibles , automatisées et permettent de différencier les classes d'Ig (IgG , IgM , IgA).



ELISA

Sérums:1 à 12

Dilutions de sérums



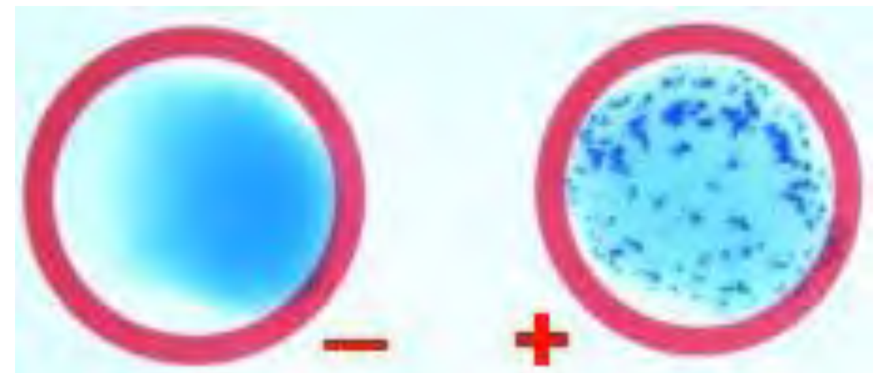
Dr AMMARI-Cours de microbiologie- 3ème année Médecine

L'agglutination passive :

-une agglutination bactérienne directe en tubes (EX: Technique du SéroDc de Widal et Felix)



-Ou une agglutination utilisant des Ag fixés sur un support de particules inertes (Techniques rapides, simples , souvent sensibles et spécifiques).



En résumé , dans toutes les techniques , l'Ag est mis en contact avec le sérum (Ac) du malade:

- Soit sous forme de solution (Résultat: Agglutination visible à l'œil nu)

- Soit fixé sur un support (microplaque , lame pour Immunofluorescence).

La révélation du complexe Ag-Ac se fait en utilisant une Anti-Ig:

- marquée par un Fluorochrome (IFI)

- ou une Enzyme dont on rajoute secondairement le substrat (ELISA) .

IV- Les techniques de Biologie moléculaire :

La PCR , ou réaction de polymérisation en chaîne (CARRY MULLIS ,1985) est une technique qui permet d'amplifier une région bien précise du génome.

Applications:

- Infections dues à des bactéries à croissance difficile ou très lente.

Même si le germe est présent dans le prélèvement à de très faibles concentrations, on peut ainsi détecter sa présence .
Ex: Dc des tuberculoses paucibacillaires, des infections génitales et des endocardites à hémoculture négative.

- Détection des gènes de résistance aux ATB.

Intérêt de la PCR: rapidité, sensibilité et spécificité .

Inconvénient: prix de revient élevé (réservée à certains laboratoires équipés).